

# Regulación de la neurotransmisión glicinérgica en procesos de dolor inflamatorio: una nueva vía de acción de la prostaglandina E2 en médula espinal

Jaime de Juan-Sanz, Enrique Núñez, Beatriz López-Corcuera, Carmen Aragón

Departamento de Biología Molecular, Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (CSIC-UAM), Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, España. Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), ISCIII, Madrid, España. Instituto de investigación Hospital Universitario La Paz (IdiPAZ), Madrid, España.  
e-mail: jdejuan@cbm.uam.es

*Premio Abelló del Concurso Científico 2012 de la Real Academia Nacional de Farmacia. An. Real Acad. Farm. Vol 79, Nº 3 (2013), pag. 434-449.*

## RESUMEN

La acción de la glicina como neurotransmisor inhibidor es finalizada por su recaptación del espacio sináptico a través de dos transportadores específicos, GlyT1 (isoforma glial) y GlyT2 (isoforma neuronal). En este trabajo describimos un mecanismo mediante el cual la unión de la prostaglandina E2 (un importante mediador del dolor inflamatorio) a sus receptores EP3 activa la recaptación de glicina llevada a cabo por GlyT2. Esta activación coincide con una disminución de la ubiquitinación del transportador, modificación post-traducciona l necesaria para su correcto tráfico intracelular. Una menor ubiquitinación de GlyT2 produce una acumulación del transportador en la superficie neuronal, lo que explica la activación observada. Por tanto, los resultados de este trabajo sugieren que GlyT2 es una interesante diana terapéutica cuya inhibición podría contribuir a la reducción del dolor inflamatorio.

**Palabras clave:** Neurotransmisión glicinérgica, Prostaglandina E2, Ubiquitinación.

## ABSTRACT

### *Regulation of the glycinergic neurotransmission during inflammatory pain: A new pathway in the action of Prostaglandin E2 in the spinal cord*

Glycinergic inhibitory neurotransmission is terminated by reuptake through specific transporters, GlyT1 (glial isoform) and GlyT2 (neuronal isoform). In this work we describe that Prostaglandin E2 (PGE2, an important mediator of inflammatory pain) activates GlyT2-mediated recapture of glycine via interaction with the EP3 receptor. Moreover, in these conditions a diminished ubiquitination of GlyT2 is observed. Ubiquitination is an important modification for the correct trafficking of this transporter. We propose that the reduction of ubiquitination leads to accumulate GlyT2 in the neuronal surface, which could explain the PGE2-mediated activation of GlyT2. Therefore, our results suggest that GlyT2 is an interesting therapeutic target and its inhibition could contribute to reduce inflammatory pain.

**Keywords:** Glycinergic neurotransmission, Prostaglandin E2, Ubiquitination.

## 1. INTRODUCCIÓN

Las vías aferentes sensitivas tienen la capacidad de transmitir al cerebro sensación de dolor en respuesta a estímulos que potencialmente pueden producir daños en los tejidos del cuerpo. Estas vías, llamadas vías nociceptivas, se componen de fibras nerviosas que poseen un diámetro reducido, están frecuentemente demielinizadas y conectan los tejidos periféricos con el sistema nervioso central (SNC). En el tejido periférico se encuentran las terminaciones de las neuronas nociceptoras, que se pueden activar al recibir un estímulo potencialmente dañino generando un potencial de membrana que es transmitido a lo largo de la neurona hasta llegar a las astas dorsales de la médula espinal. Ahí se forman contactos sinápticos locales con interneuronas excitadoras e inhibitoras, y con proyecciones neuronales provenientes de las áreas superiores del SNC mediante las cuales se transmite la información al cerebro. Esta red de contactos locales en la médula es un primer punto de control de la transmisión del dolor, pudiendo favorecer o no la propagación de este. Es lo que se ha denominado Compuerta Espinal en la teoría de la Compuerta o Puerta de Entrada propuesta por Melzack y Wall en 1965 (1).

Las interneuronas inhibitoras que forman estos contactos locales en la Compuerta Espinal utilizan dos tipos de neurotransmisores: el ácido gamma-aminobutírico (GABA) y la glicina. De los dos, la glicina se ha propuesto como el principal neurotransmisor inhibitor en áreas caudales del SNC, estando muy implicada en el procesamiento de la información sensorial (2). Así, el mecanismo de acción de la glicina en la médula espinal se lleva a cabo mediante la liberación

del neurotransmisor al espacio sináptico y la posterior unión a su receptor, GlyR, en la postsinapsis, produciendo la entrada de iones cloruro que inhiben la posible excitación de la neurona postsináptica. Esta inhibición es finalizada gracias a la recaptación de la glicina del espacio sináptico por dos transportadores específicos, GlyT1 (isoforma glial) y GlyT2 (isoforma neuronal) (3). GlyT2 tiene además la función de recapturar glicina hacia el terminal presináptico para facilitar su reincorporación de nuevo a vesículas sinápticas, ayudando a preservar su contenido cuántico y permitiendo de este modo su reutilización (4).

Este tipo de neurotransmisión inhibitoria es regulada por procesos de ubiquitinación, un mecanismo por el cual se adiciona una o varias moléculas de ubiquitina a una proteína modificando su endocitosis, compartimentalización o degradación, siendo un proceso que globalmente puede regular importantes funciones celulares (5). De este modo, se ha demostrado que la ubiquitinación puede modificar la neurotransmisión glicinérgica regulando el tráfico del receptor de glicina GlyR (6) y de los transportadores específicos GlyT1 (7) y GlyT2 (8). En estos últimos se ha demostrado que se produce una ubiquitinación específica de la última lisina del extremo carboxilo terminal (posición 619 para GlyT1, posición 791 para GlyT2) tras la activación de proteína kinasa C (PKC) por ésteres de forbol, como es el phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA). Esto induce la endocitosis de ambos transportadores, produciéndose por tanto una disminución de su función.

Otra característica que ha sido relacionada con la neurotransmisión glicinérgica es la transmisión de dolor. En este sentido, se han encontrado durante los últimos 10 años múltiples evidencias que relacionan situaciones de dolor inflamatorio con una disminución en la función de la neurotransmisión glicinérgica. Así, se ha confirmado que durante el dolor inflamatorio: 1) existe una apoptosis específica de interneuronas GABAérgicas y glicinérgicas (9-11); 2) en las neuronas que reciben terminales glicinérgicos se produce un aumento en la concentración intracelular de cloruro por inhibición del canal KCC-2 (mediada por la presencia de BDNF) (12, 13); y 3) existe una disminución de la neurotransmisión glicinérgica por la liberación de la prostaglandina E2 (PGE2) (14).

Las prostaglandinas están ampliamente implicadas en procesos de dolor. Son moléculas derivadas del ácido araquidónico (AA) que es liberado gracias a la activación de la fosfolipasa A2 durante procesos inflamatorios. El AA es transformado en los precursores de prostaglandinas PGG2 y PGH2 por las enzimas ciclooxigenasa 1 (COX-1, expresada constitutivamente) y ciclooxigenasa 2 (COX-2, de expresión inducible). Así, la inhibición farmacológica específica de COX-1 es utilizada a diario (con aspirina y fármacos relacionados) como un método analgésico que limita la producción de prostanoides.

En concreto, la producción y presencia de la Prostaglandina E2 (PGE2), que actúa a través de los receptores EP (EP1-4), se ha demostrado como un efector esencial del dolor inflamatorio mediante la generación de ratones deficientes en la principal enzima responsable de su síntesis, la Prostaglandina E Sintasa I microsomal (mPGE1). Los ratones mPGE1 (-/-) presentan niveles altamente reducidos de PGE2 junto a una menor inflamación y una respuesta claramente reducida en tests de dolor (15-17). PGE2 favorece por tanto la transmisión del dolor inflamatorio, y uno de los principales mecanismos responsables es la inhibición que produce sobre la neurotransmisión glicinérgica inhibitoria a nivel medular. La razón de esta inhibición parece deberse a las modificaciones que la presencia de PGE2 produce sobre el receptor de glicina (GlyR). En concreto, se ha descrito una disminución de la actividad de la subunidad GlyRa3 del receptor de glicina expresada en las capas más superficiales del asta dorsal de la médula espinal (18). Así, la PGE2 producida por mPGE1 activa a los receptores específicos EP2, que están acoplados a proteínas G estimuladoras (Gs) y producen un aumento del AMP cíclico (AMPC) intracelular. Esto desencadena la activación de la proteína quinasa A (PKA) que fosforila los receptores de glicina en la serina 346 de la subunidad GlyRa3, produciendo la inhibición del receptor y por tanto disminuyendo considerablemente la inhibición mediada por glicina (18-20).

En este trabajo proponemos un nuevo mecanismo mediante el cual PGE2 regula la neurotransmisión glicinérgica. Así, nuestros resultados demuestran una activación del transportador presináptico GlyT2 en presencia de PGE2 en sinaptosomas de tallo cerebral y médula espinal de rata de una manera dependiente del tiempo. Además, el uso de agonistas y compuestos farmacológicos selectivos sugiere la implicación de los receptores específicos EP3 en la transducción de esta señal. Así, el transporte de GlyT2 en presencia de Sulprostona (agonista de EP3, y en menor medida de EP1) y Beraprost (agonista de EP3) se activa de una manera similar a la activación producida por PGE2, mientras que Butaprost (agonista de EP2) o TCS250 (agonista de EP4) no producen variaciones. Además, nuestros resultados sugieren una activación de GlyT2 mediada por su desubiquitinación, una modificación implicada en su tráfico intracelular (8), que lo haría más estable en la membrana evitando su endocitosis y degradación, y aumentando el número de moléculas activas presentes en la superficie celular, lo que se traduce en una recaptación acelerada del neurotransmisor, y por tanto una disminución en la neurotransmisión glicinérgica. De esta manera, PGE2 aparece como un regulador que actúa de forma coordinada sobre las neuronas presinápticas y postsinápticas implicadas en la neurotransmisión glicinérgica, produciendo una inhibición de la acción de la glicina en la médula que facilita y promueve la transmisión del dolor hacia áreas superiores del SNC.

## **2. MATERIAL Y MÉTODOS**

Las ratas tipo Wistar fueron mantenidas en condiciones estándar en el Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, siguiendo las pautas actuales en el uso de animales en la investigación en Neurociencia. La glicina tritiada ([<sup>3</sup>H]-glicina) se obtuvo en PerkinElmer Life Sciences y NFPS (inhibidor de GlyT1) y ALX-1393 (inhibidor de GlyT2) fueron adquiridos en Sigma-Aldrich. PGE2 y TCS250 se obtuvieron de Tocris Bioscience mientras que Beraprost, Butaprost y Sulprostona se obtuvieron de Cayman Chemical, de donde provienen también los anticuerpos específicos anti-EP1, EP2, EP3 y EP4. El anticuerpo para calnexina fue de Stressgen, anti-multi Ubiquitina unido a agarosa se obtuvo de MBL international y el anticuerpo anti GlyT2 fue producido en el laboratorio (3).

### ***2. 1. Electroforesis y Western Blot***

Tras medir la concentración de proteínas en las distintas muestras por el método de Bradford, estas fueron sometidas a electroforesis en un gel de SDS-PAGE utilizando geles concentrador (4%) y separador (7,5%). Las muestras fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa por electrotransferencia semiseca (Life Technologies, Inc.; 1,2 mA.cm<sup>-2</sup> 1 h), se bloquearon con leche 5% en PBS durante 1 h a temperatura ambiente y se incubaron con los distintos anticuerpos de interés a las concentraciones indicadas por los fabricantes, a 4°C durante la noche. Tras varios lavados, los anticuerpos unidos se detectaron con IgGs unidas a peroxidasa, específicas para la detección de la especie en la que se obtuvo el primario. Las bandas se visualizaron por ECL (VWR International, Canada). El análisis cuantitativo de las bandas se realizó por densitometría en un densitómetro GS-800 de BioRad utilizando el software Quantity One 4.6.

### ***2. 2. Obtención de sinaptosomas purificados de médula espinal de rata***

Se sacrificaron 6-8 ratas adultas por intoxicación con monóxido de carbono. Se decapitaron y se extrajeron las médulas espinales. Tras un homogeneizado en potter tipo Dounce vidrio-vidrio, se realizaron las siguientes centrifugaciones a 4°C en rotores JA.25.50 de Beckman: a) 4 min, 5500 r.p.m. y se recuperó el sobrenadante, b) 15 min, 14000 r.p.m. se retiró el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en buffer sacarosa 0,32 M pH 7,4. c) 7 min, 17000 r.p.m., tras colocar la muestra en un gradiente discontinuo (25% - 15% - 5%) de Percoll (Sigma) disuelto en buffer sacarosa 0,32 M pH 7,4. Se recuperó la interfase entre 15-25% y se resuspendió en HBM (ClNa 140 mM, ClK 5 mM, Cl<sub>2</sub>Ca 1mM, Cl<sub>2</sub>Mg 1mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1mM, HNaCO<sub>3</sub>, HepesNaOH pH 7,4 20mM, Glucosa 10mM) para realizar dos nuevas centrifugaciones que lavan el sedimento de Percoll d) 15 min, 15000 r.p.m. y e) 10 min 5500 r.p.m. Se resuspendió en HBM, se midió proteína por Bradford y se ajustó a 2 mg/ml.

### **2. 3. Transporte de glicina tritiada en sinaptosomas**

Tras el correspondiente tratamiento de los sinaptosomas con PGE2 u otro compuesto, se midió la glicina tritiada incorporada en estos. Así, se añaden 40 µg de sinaptosomas por condición (utilizando como mínimo cuadruplicados) a medio HBM atemperado a 37°C que contiene NFPS 10 µM (para inhibir GlyT1) y 2µl/ml de [3H]-glicina, 1.6 TBq/mmol (PerkinElmer Life Sciences), diluida isotópicamente una concentración de 10µM. Tras 10 minutos de incubación en agitación a 37°C, se lavaron con phosphate-buffered saline (PBS) (NaCl 137 mM, 0.9mM CaCl2, 2.68mM KCl, 1.47 mM KH2PO4, 0.49mM MgCl2, 7.37 mM Na2HPO4, pH 7.4) para retirar la [3H]-glicina no incorporada al interior de los sinaptosomas. El transporte de GlyT2 se mide como la diferencia entre la acumulación de [3H]-glicina a 10 µM, restando la acumulación obtenida en presencia del inhibidor específico de GlyT2 (ALX-1393) que correspondería al transporte basal de los sinaptosomas.

### **2. 4. Inmunoprecipitación anti-multi ubiquitina**

Se separaron 200 ug de sinaptosomas por condición, que fueron lisados en buffer de lisis conteniendo NP-40 0,25%, NaCl 150mM, Tris-HCl 25mM y N-Etilmaleimida 50mM. Tras 30 minutos a temperatura ambiente en agitación, se centrifugaron las diferentes muestras para retirar restos celulares no solubilizados y se incubaron una hora a temperatura ambiente en presencia de un anticuerpo anti-multi ubiquitina unido a agarosa (clon FK2). Las proteínas ubiquitinadas se aislaron por precipitación de la agarosa mediante una centrifugación suave (8000 r.p.m., 3 min), se eluyeron a 75°C durante 10 minutos y se cargaron en un gel SDS-PAGE, revelando por western blot la cantidad de GlyT2 ubiquitinado.

### **2. 5. Análisis estadístico**

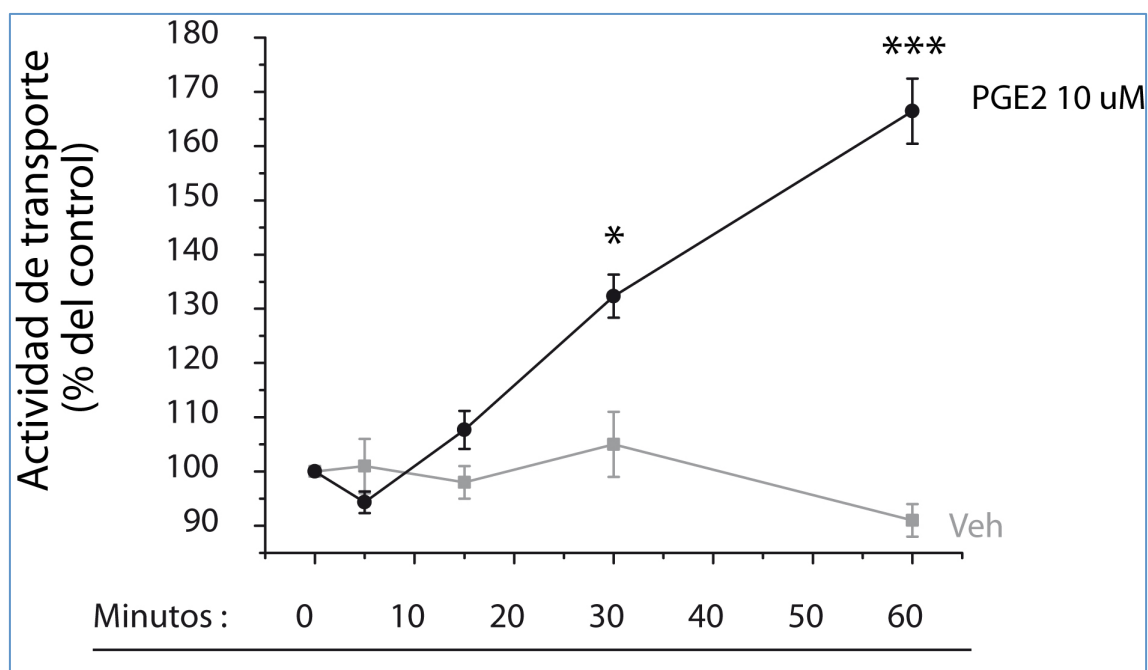
Los datos se muestran como medias ± error estándar de la media (Standard Error Mean, SEM). Las diferencias estadísticas entre dos grupos se determinaron por una prueba t de Student, mientras que la comparación entre más de dos grupos se realizó mediante el análisis de la varianza (ANOVA, ANalysis Of VAriance, según terminología inglesa). P < 0,05 se consideró significativo, y es denotado con \*. Otras equivalencias son \*\* para P < 0,01 y \*\*\* para P < 0,001.

## **3. RESULTADOS**

### **3.1. PGE2 activa la recaptación de glicina mediada por el transportador GlyT2 a través de la activación de los receptores EP3**

Teniendo en cuenta el papel crítico que juega GlyT2 en la neurotransmisión glicinérgica (21) y la regulación que PGE2 produce sobre la misma (14), nos preguntamos si la actividad de GlyT2 se vería afectada junto a la del receptor de glicina, modulando de manera coordinada el proceso desde las neuronas pre- y postsinápticas. Para ello medimos la actividad específica de GlyT2 en sinaptosomas

de médula espinal de rata en presencia o ausencia de 10  $\mu$ M PGE2 durante diferentes tiempos. Estas medidas se realizan midiendo la cantidad de glicina tritiada incorporada en los sinaptosomas por unidad de tiempo, y se realizan en presencia de NFPS (un inhibidor específico de GlyT1) para cuantificar el transporte de glicina radiactiva únicamente debido a la actividad de GlyT2. Como se observa en la Figura 1, fuimos capaces de determinar que efectivamente PGE2 produce variaciones sobre la recaptación llevada a cabo por GlyT2. Así, observamos que la actividad de GlyT2 aumenta de un modo dependiente del tiempo en presencia de PGE2, llegando a alcanzar un aumento del transporte del  $66,43 \pm 6,3\%$  a los 60 minutos, pero detectándose a los 30 min con una activación significativa del  $32,33 \pm 4,1\%$ .

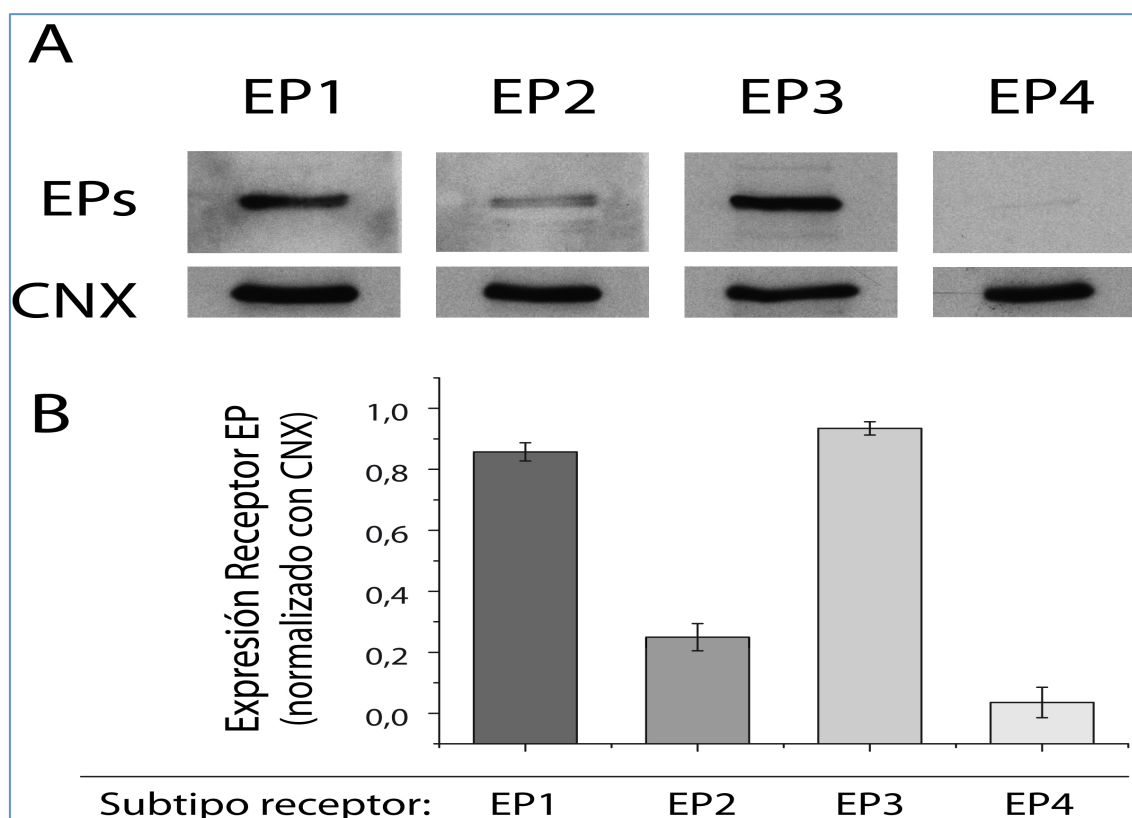


**Figura 1.- PGE2 activa el transporte mediado por GlyT2 en sinaptosomas de médula espinal de rata.** Los sinaptosomas de médula espinal de rata fueron incubados durante los tiempos indicados en presencia de 10  $\mu$ M PGE2. Se determinó la cantidad de glicina tritiada incorporada, midiendo cada tiempo ensayado por cuadruplicado, y se muestra la media resultante de cuatro experimentos  $\pm$  SEM (error estándar de la media). La comparación entre los distintos tiempos se realizó mediante el análisis de la varianza (ANOVA). Los niveles de significación corresponden a \*  $p < 0,05$  y \*\*\*  $p < 0,001$ .

La PGE2 es liberada durante eventos de dolor inflamatorio, y puede realizar su efecto a través de cuatro posibles receptores: EP1, EP2, EP3 y EP4. Estos receptores se expresan en una amplia mayoría de tejidos, incluyendo la médula espinal (22, 23) y median su acción a través de diferentes cascadas de señalización (24, 25). Para determinar la implicación de los distintos subtipos de receptores en la activación de GlyT2 por PGE2, quisimos cuantificar la expresión de cada uno en sinaptosomas de médula espinal de rata. De este modo, la expresión del receptor, que está estrechamente ligada a su posible acción, indica la capacidad de transducción de esa vía en concreto en la muestra de interés. Así, mediante la



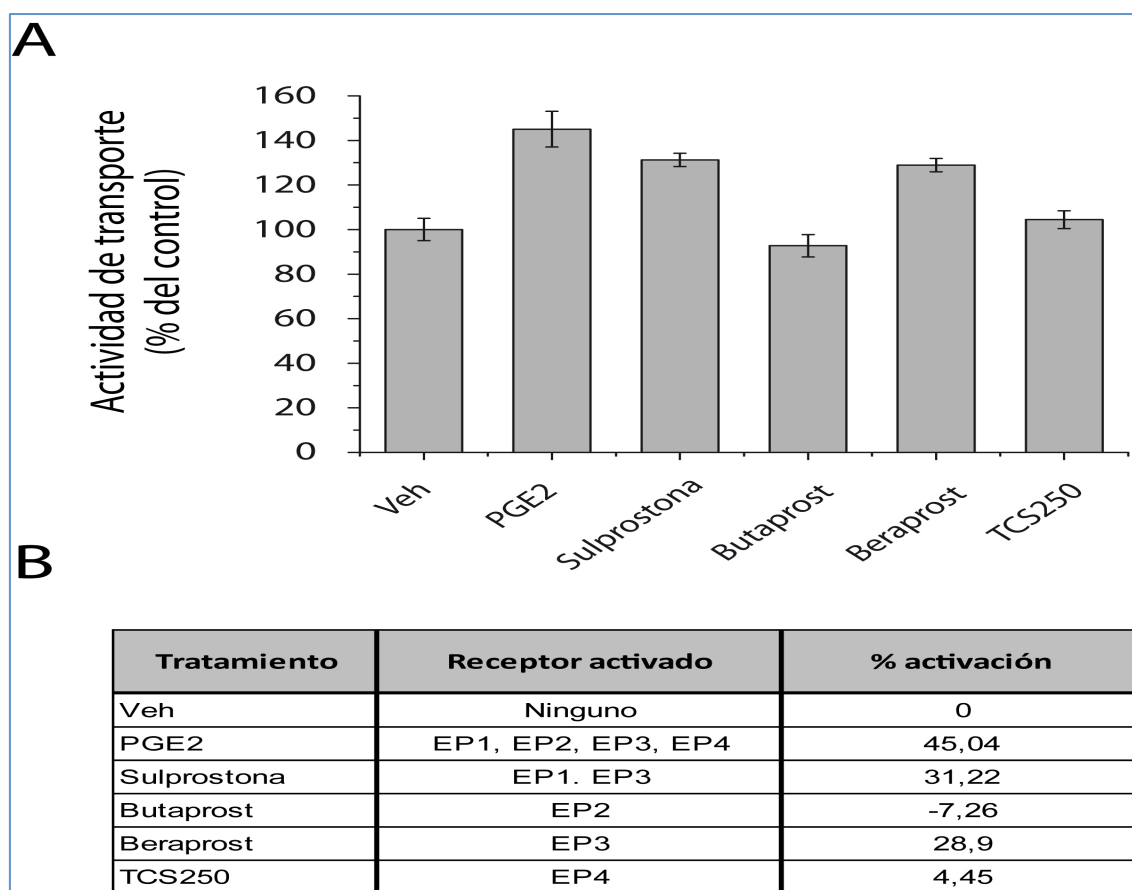
técnica de Western blot y detección con anticuerpos específicos de cada subtipo de receptor pudimos observar y cuantificar la expresión de cada uno, detectando una mayor expresión de los receptores EP1 y EP3, y una menor expresión de los receptores EP2 y EP4 (Figura 2A-B), lo que sugeriría una mayor implicación de EP1 y EP3 en la activación de GlyT2. Aunque algunos efectos inducidos por PGE2 en distintos tejidos son mediados por la contribución de varios subtipos de receptores EP a la vez (26, 27), lo más común es que únicamente la transducción a través de un solo subtipo resulte determinante para el efecto concreto (19, 28-31). De este modo, para determinar la implicación de cada posible vía de transducción utilizamos agonistas específicos de cada uno de los receptores, intentando determinar la contribución aislada de cada subtipo de receptor sobre la activación de GlyT2 mediada por PGE2. Los agonistas utilizados fueron: sulprostona, beraprost, butaprost y TCS250. La sulprostona activa los receptores EP1 y EP3 con unas constantes de afinidad de 21 nM y 0,6 nM (25), de manera que puede ser utilizada para determinar el efecto de ambos receptores a la vez. beraprost es un agonista para EP2, Butaprost activa selectivamente a EP3 y TCS250 es un compuesto relativamente reciente que activa específicamente a EP4.



**Figura 2.- Los receptores EP3 y EP1 se expresan en mayor medida que los receptores EP2 y EP4 en sinaptosomas de médula espinal de rata.** A-B) 20 µg/carril de lisados de sinaptosomas de médula espinal de rata fueron cargados en gel SDS-PAGE. Cada receptor se reveló con su anticuerpo específico, y se reincubó anti-calnexina (CNX) como control de carga. B) La densitometría de cada receptor fue normalizada respecto a la detección de CNX, y se representa con unidades arbitrarias.



El efecto de cada uno de estos compuestos fue ensayado sobre la actividad endógena de GlyT2 en sinaptosomas de médula espinal de rata (Figura 3). Así, se observó que el tratamiento durante una hora a 37°C con estos compuestos producía distintos efectos; mientras que la activación selectiva de EP2 o EP4 no es capaz de emular el efecto de PGE2, la activación de EP1 y EP3, o solamente EP3, producía un fenotipo similar al observado en presencia de la prostaglandina. De estos resultados se desprende que la contribución de la activación de EP2 y EP4 al efecto ejercido por PGE2 sobre GlyT2 es mínima y, por otro lado, mientras que el efecto de la sulprostona podría sugerir la implicación simultánea de los receptores EP1 y EP3, los resultados con butaprost confirman que únicamente la activación de EP3 es capaz de aumentar la actividad de GlyT2, con lo que se podría deducir que la contribución de EP1 es probablemente muy baja. Así, el conjunto de estos resultados implica directamente al subtipo EP3 en la regulación de GlyT2 por PGE2 en la presinapsis.

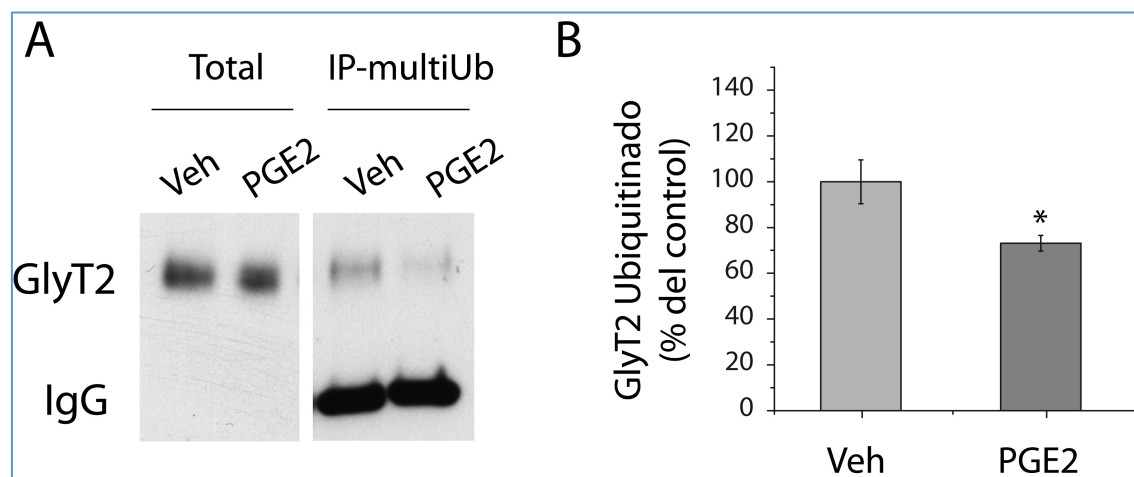


**Figura 3.- La activación específica de los receptores EP1 y EP3, o sólo EP3 produce una activación en el transporte de GlyT2.** A-B) Los sinaptosomas de médula espinal de rata fueron incubados durante 1 hora a 37°C en presencia de vehículo (Veh), PGE2, sulprostona, beraprost, butaprost y TCS250 (todos ellos a 10 µM). Se determinó la cantidad de glicina tritiada incorporada, midiendo cada tiempo ensayado por cuadruplicado, y se muestra el diagrama de barras correspondiente a la media de tres experimentos independientes ± SEM (error estándar de la media). B) Tabla de correspondencias entre los diferentes agonistas y los receptores que activan específicamente, mostrando en la columna de la derecha el % de activación en cada condición.

### **3. 2. La presencia de PGE2 reduce la ubiquitinación de GlyT2**

En el caso de GlyT2 y otros transportadores de neurotransmisores, la ubiquitinación se ha demostrado como una herramienta eficiente que posee la célula para mantener un control fino del número de moléculas presentes en la membrana plasmática, de tal modo que la imposibilidad de adición de moléculas de ubiquitina a los transportadores se traduce en un aumento del número de moléculas activas en la superficie celular, ya que su endocitosis se encuentra bloqueada (7, 8, 32, 33). Por tanto, quisimos determinar si el aumento de actividad de GlyT2 por PGE2 podría estar relacionado con variaciones en el estado de ubiquitinación del transportador. Para ello realizamos incubaciones de sinaptosomas durante una hora en presencia o ausencia de 10 $\mu$ M PGE2, y cuantificamos la cantidad de GlyT2 ubiquitinado. Esto se realiza mediante el uso de un anticuerpo anti-multi ubiquitina unido a agarosa (clon FK2), que reconoce proteínas mono y poliubiquitinadas, pero no ubiquitina libre (34). De este modo, desde un lisado de sinaptosomas previamente tratados con PGE2 o vehículo se pueden inmunoprecipitar y aislar todas las proteínas ubiquitinadas y, mediante Western blot, podemos cuantificar únicamente las variaciones que se han producido sobre GlyT2 y establecer diferencias.

Como se observa en la Figura 4, mientras que la cantidad de proteína total correspondiente a GlyT2 no se ve afectada por la presencia de PGE2, la proporción de transportador ubiquitinado disminuye significativamente hasta un  $68,74 \pm 5,6\%$ . Estos resultados sugerirían que la activación del transporte específico de GlyT2 en presencia de PGE2, presumiblemente a través de los receptores EP3, puede deberse a la disminución de la ubiquitinación del transportador. Esto favorecería la proporción de GlyT2 desubiquitinado incapaz de endocitar al interior celular, aumentando por tanto el número de moléculas activas en la superficie celular. Así, se produciría un aumento global de la recaptación de glicina en la sinapsis y por tanto una menor neurotransmisión por falta de neurotransmisor en el espacio sináptico, lo que contribuye y refuerza, desde la presinapsis, a la inhibición de la neurotransmisión glicinérgica debida a la disminución de la actividad del receptor postsináptico (18).



**Figura 4.- PGE2 disminuye la ubiquitinación de GlyT2.** A-B) 200  $\mu$ g de sinaptosomas de médula espinal de rata fueron incubados durante 1 hora a 37°C en presencia de vehículo (Veh) o 10  $\mu$ M PGE2. Después de esto se separaron 10  $\mu$ g para cuantificar proteína total (A, parte izquierda) y sobre el resto (190  $\mu$ g) se inmunoprecipitaron las proteínas ubiquitinadas con un anticuerpo anti-multi ubiquitina unido a agarosa. Tras separar las proteínas en gel SDS-PAGE se determinó la cantidad de GlyT2 total y ubiquitinado (A, parte derecha). Como se observa, la presencia de PGE2 produce una bajada de GlyT2 ubiquitinado, mientras que la proteína total se mantiene constante. B) Cuantificación de tres experimentos independientes como el mostrado en A. Se muestra la cantidad de GlyT2 ubiquitinado como porcentaje del control (Veh). La comparación entre ambas condiciones se realizó mediante una prueba t de Student.  $p < 0,05$  se consideró significativo, y se denota con \*.

#### 4. DISCUSIÓN

La falta de inhibición mediada por la neurotransmisión glicinérgica en la médula espinal se ha demostrado como una característica claramente implicada en el aumento de la sensación de dolor (14, 35). Uno de los mecanismos descritos que regula este tipo de neurotransmisión se basa en una inhibición específica de la subunidad GlyR $\alpha$ 3 del receptor de glicina en presencia de la prostaglandina E2 (PGE2), uno de los mediadores más importantes de la inflamación (15-17). Esta inhibición ocurre a través de los receptores EP2, que producen un aumento del AMPc intracelular. Esto provoca una activación a la proteína kinasa A (PKA) que fosforila específicamente a la subunidad GlyR $\alpha$ 3 del receptor de glicina en la serina de la posición 346, impidiendo su acción y por tanto reduciendo la neurotransmisión glicinérgica inhibidora (18).

El óptimo funcionamiento de la neurotransmisión glicinérgica requiere por tanto la correcta actividad y localización del receptor de glicina. Sin embargo, otras muchas proteínas son necesarias, y tienen la capacidad de regular este tipo de neurotransmisión. Un ejemplo claro es el transportador neuronal presináptico GlyT2, ya que ratones deficientes en esta proteína tienen completamente alterada la neurotransmisión glicinérgica (21). Sin embargo, hasta la fecha se han realizado muy pocos estudios que profundicen sobre la posible implicación de este transportador en el procesamiento del dolor, a pesar de que recientemente se ha propuesto como una interesante diana analgésica, ya que se ha descrito que su

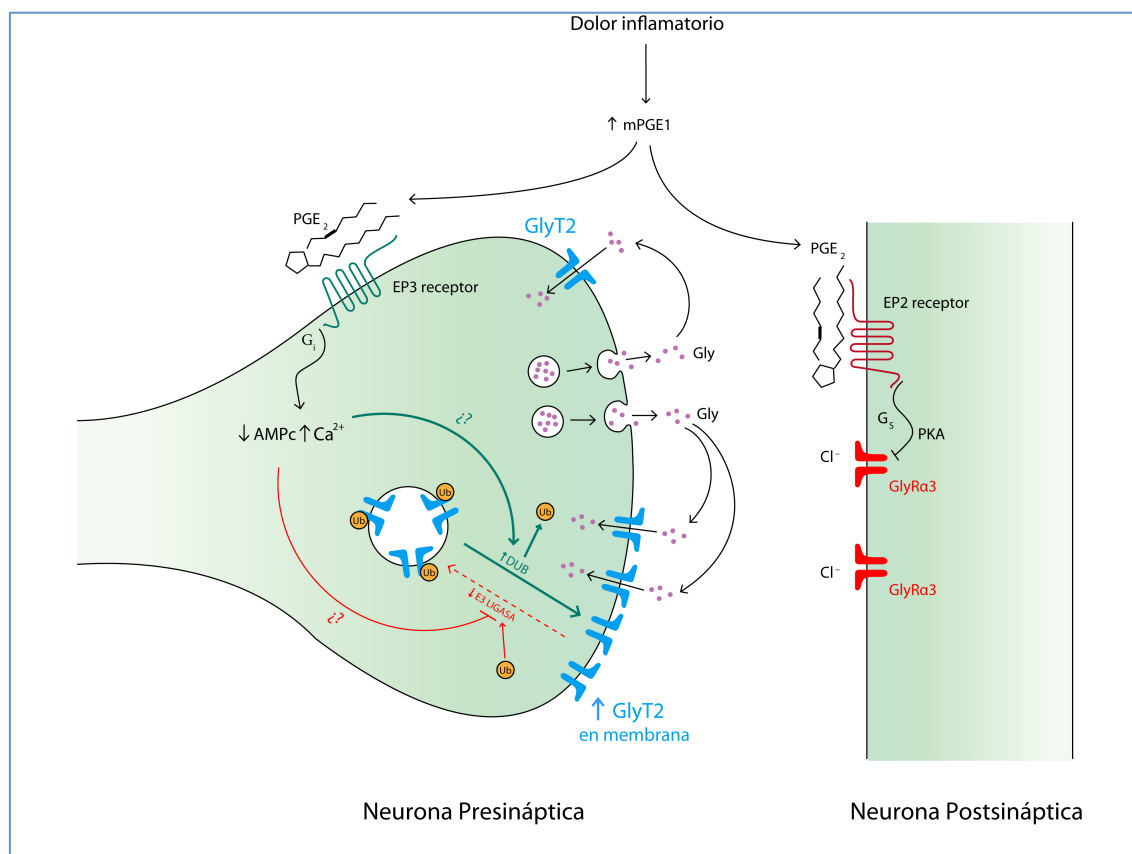
bloqueo farmacológico específico parece reducir la sensación de dolor en ratas (36, 37).

De este modo, consideramos de interés profundizar en los mecanismos moleculares de la posible implicación de GlyT2 en la acción de PGE2 sobre la inhibición glicinérgica. En este trabajo hemos observado que PGE2 produce una activación de la recaptación presináptica llevada a cabo por GlyT2 y, gracias al uso de agonistas específicos de los receptores EP de la prostaglandina, hemos podido determinar la implicación del subtipo de receptor EP3 en el efecto observado. En consonancia con esto, hemos detectado que la expresión del receptor EP3 en sinaptosomas de médula espinal de rata está muy por encima de la expresión de los subtipos EP2 y EP4, y ligeramente por encima de la expresión de EP1, lo que es coherente con los resultados obtenidos.

En concreto, la activación de los receptores EP3 conlleva usualmente disminuciones notables de AMP cíclico (AMPC) y aumentos en la concentración de calcio ( $\text{Ca}^{+2}$ ) intracelular (24). Se ha descrito que aumentos de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular pueden producir una desubiquitinación de un amplio número de proteínas en la sinapsis (38) por lo que quisimos comprobar si GlyT2 podría sufrir desubiquitinación tras un aumento de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular llevado a cabo por la activación del receptor EP3. Esto se realizó inmunoprecipitando proteínas ubiquitinadas desde sinaptosomas de médula de rata, y comprobando si PGE2 producía cambios en la cantidad de GlyT2 ubiquitinado. Los resultados mostraron una disminución significativa en la ubiquitinación de GlyT2 tras el tratamiento con PGE2, mientras que la cantidad total de proteína no se vió afectada. La ubiquitinación de GlyT2 ha sido recientemente descrita como una modificación necesaria para la endocitosis del transportador, de tal modo que la incapacidad de ubiquitinar a GlyT2 en la lisina 791 de su carboxilo terminal impide su endocitosis regulada por PKC (8). La imposibilidad de endocitosis por la falta de ubiquitinación produce, por tanto, un acúmulo del transportador en la superficie celular (como ocurre con otras proteínas; 39), lo que conlleva un aumento del número de moléculas activas en membrana plasmática, aumentando por tanto la actividad global de GlyT2. Este aumento de actividad produce una aceleración de la recaptación del neurotransmisor, disminuyendo el tiempo de acción de este en el espacio sináptico y reduciendo la acción sináptica de la glicina.

En conjunto, estos datos muestran que PGE2 disminuye la neurotransmisión glicinérgica mediante dos efectos coordinados en la postsinapsis y en la presinapsis: 1) en la postsinapsis promueve una disminución de la actividad del receptor GlyR $\alpha$ 3 por fosforilación directa dependiente de la transducción por receptores EP2 (18); y 2) en la presinapsis produce un aumento de la recaptación de glicina desde el espacio sináptico mediada por el transportador GlyT2, presumiblemente a través de los receptores EP3 y que probablemente es debida a

un acúmulo de transportador activo desubiquitinado en la superficie neuronal (Figura 5). Así, el transporte mediado por GlyT2 estaría sobreactivado en situaciones de dolor inflamatorio dependientes de PGE2. GlyT2 podría representar una posible diana terapéutica en estas situaciones, ya que su inhibición específica aumentaría la presencia de glicina en el espacio sináptico y por tanto activaría la neurotransmisión glicinérgica reduciendo la transmisión de la señal nociceptiva.



**Figura 5.- Esquema-resumen de la acción inhibidora coordinada de PGE2 sobre neuronas presinápticas y postsinápticas en la neurotransmisión glicinérgica.** Se muestra en la zona de la derecha un resumen de la acción previamente descrita (18) sobre el receptor GlyRa3: PGE2 interacciona con el receptor EP2, y este activa a la proteína kinasa A (PKA) mediante la transducción llevada a cabo por proteínas G estimuladoras (Gs). La PKA fosforila a GlyRa3, bloqueando su acción e impidiendo la entrada de iones cloruro (Cl<sup>-</sup>) en la neurona postsináptica (18). En la zona de la izquierda se muestra la regulación de PGE2 descrita en este artículo sobre la presinapsis: PGE2 interacciona con el receptor EP3, y este produce una bajada de AMPc y un aumento de la concentración de calcio intracelular (Ca<sup>2+</sup>) mediante la transducción llevada a cabo por proteínas G inhibidoras (Gi). Mediante mecanismos aún por determinar (denotados por “¿?”) la bajada de AMPc o el aumento Ca<sup>2+</sup> producen un desequilibrio del ciclo ubiquitinación/desubiquitinación del transportador de glicina presináptico GlyT2 por dos posibilidades: 1) inactivación de la E3 ligasa correspondiente (en rojo) o 2) activación de la desubiquitinasa correspondiente (DUB; en verde). De este modo, se reduce la ubiquitinación de GlyT2, lo que produce una acumulación del transportador en membrana, y por tanto un aumento de la recaptación de glicina (Gly) liberada. Esto disminuye la concentración efectiva de glicina en el espacio sináptico y limita su acción como neurotransmisor.

## **5. AGRADECIMIENTOS**

Este trabajo se ha realizado con la financiación del Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF2008-05436 y SAF2011-28674), la Comunidad Autónoma de Madrid (SSAL-0253/2006) y la Fundación Ramón Areces.

## **6. REFERENCIAS**

1. Melzack R.; Wall P.D. Pain mechanisms: a new theory. *Science* 150, 971-9 (1965).
2. Legendre P. The glycinergic inhibitory synapse. *Cell. Mol. Life. Sci.* 58, 760-93 (2001).
3. Zafra F.; Aragón C.; Olivares L.; Danbolt N.C.; Giménez C.; Storm-Mathisen J. Glycine transporters are differentially expressed among CNS cells. *J. Neurosci.* 15, 3952-69 (1995).
4. Aragón C.; López-Corcuera B. Structure, function and regulation of glycine neurotransporters. *Eur. J. Pharmacol.* 479, 249-62 (2003).
5. Welchman R.L.; Gordon C.; Mayer R.J. Ubiquitin and ubiquitin-like proteins as multifunctional signals. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 6, 599-609 (2005).
6. Büttner C.; Sadtler S.; Leyendecker A.; Laube B.; Griffon N.; Betz H.; Schmalzing G. Ubiquitination precedes internalization and proteolytic cleavage of plasma membrane-bound glycine receptors. *J. Biol. Chem.* 276, 42978-85 (2001).
7. Fernández-Sánchez E.; Martínez-Villarreal J.; Giménez C.; Zafra F. Constitutive and regulated endocytosis of the glycine transporter GLYT1b is controlled by ubiquitination. *J. Biol. Chem.* 284, 19482-92 (2009).
8. de Juan-Sanz J.; Zafra F.; López-Corcuera B.; Aragón C. Endocytosis of the neuronal glycine transporter GLYT2: role of membrane rafts and protein kinase C-dependent ubiquitination. *Traffic* 12, 1850-67 (2011).
9. Moore K.A.; Kohno T.; Karchewski L.A.; Scholz J.; Baba H.; Woolf C.J. Partial peripheral nerve injury promotes a selective loss of GABAergic inhibition in the superficial dorsal horn of the spinal cord. *J. Neurosci.* 22, 6724-31 (2002).
10. Scholz J.; Broom D.C.; Youn D.H.; Mills C.D.; Kohno T.; Suter M.R.; Moore K.A.; Decosterd I.; Coggeshall R.E.; Woolf C.J. Blocking caspase activity prevents transsynaptic neuronal apoptosis and the loss of inhibition in lamina II of the dorsal horn after peripheral nerve injury. *J. Neurosci.* 25, 7317-23 (2005).
11. Polgar E.; Hughes D.I.; Riddell J.S.; Maxwell D.J.; Puskar Z.; Todd A.J. Selective loss of spinal GABAergic or glycinergic neurons is not necessary for development of thermal hyperalgesia in the chronic constriction injury model of neuropathic pain. *Pain* 104, 229-39 (2003).
12. Coull J.A.; Boudreau D.; Bachand K.; Prescott S.A.; Nault F.; Sik A.; De Koninck P.; De Koninck Y. Trans-synaptic shift in anion gradient in spinal lamina I neurons as a mechanism of neuropathic pain. *Nature* 424, 938-42 (2003).
13. Coull J.A.; Beggs S.; Boudreau D.; Boivin D.; Tsuda M.; Inoue K.; Gravel C.; Salter M.W.; De Koninck Y. BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature* 438, 1017-21 (2005).
14. Ahmadi S.; Lippross S.; Neuhuber W. L.; Zeilhofer H. U. PGE2 selectively blocks inhibitory glycinergic neurotransmission onto rat superficial dorsal horn neurons. *Nat. Neurosci.* 5, 34-40 (2002).
15. Trebino C.E.; Stock J.L.; Gibbons C.P.; Naiman B.M.; Wachtmann T.S.; Umland J.P.; Pandher K.; Lapointe J.M.; Saha S.; Roach M.L.; Carter D.; Thomas N.A.; Durtschi B.A.; McNeish J.D.; Hambor J.E.; Jakobsson P.J.; Carty T.J.; Perez J.R.; Audoly L.P. Impaired inflammatory and pain responses in mice lacking an inducible prostaglandin E synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 9044-9 (2003).



16. Kamei D.; Yamakawa K.; Takegoshi Y.; Mikami-Nakanishi M.; Nakatani Y.; Oh-Ishi S.; Yasui H.; Azuma Y.; Hirasawa N.; Ohuchi K.; Kawaguchi H.; Ishikawa Y.; Ishii T.; Uematsu S.; Akira S.; Murakami M.; Kudo I. Reduced pain hypersensitivity and inflammation in mice lacking microsomal prostaglandin synthase-1. *J. Biol. Chem.* 279, 33684-33695 (2004).
17. Mabuchi T.; Kojima H.; Abe T.; Takagi K.; Sakurai M.; Ohmiya Y.; Uematsu S.; Akira S.; Watanabe K.; Ito S. Membrane-associated prostaglandin synthase-1 is required for neuropathic pain. *Neuroreport* 15, 1395-1398 (2004).
18. Harvey R.J.; Depner U.B.; Wässle H.; Ahmadi S.; Heindl C.; Reinold H.; Smart T.G.; Harvey K.; Schütz B.; Abo-Salem O.M.; Zimmer A.; Poisbeau P.; Welzl H.; Wolfer D.P.; Betz H.; Zeilhofer H.U.; Müller U. GlyR  $\alpha 3$ : an essential target for spinal PGE<sub>2</sub>-mediated inflammatory pain sensitization. *Science*. 304, 884-7 (2004).
19. Reinold H.; Ahmadi S.; Depner U.B.; Layh B.; Heindl C.; Hamza M.; Pahl A.; Brune K.; Narumiya S.; Müller U.; Zeilhofer H.U. Spinal inflammatory hyperalgesia is mediated by prostaglandin E receptors of the EP2 subtype. *J. Clin. Invest.* 115, 673-9 (2005).
20. Malmberg A. B.; Brandon E. P.; Idzerda R. L.; Liu H.; McKnight G. S.; Basbaum A. I. Diminished inflammation and nociceptive pain with preservation of neuropathic pain in mice with a targeted mutation of the type I regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase. *J. Neurosci.* 17, 746-7470 (1997).
21. Gomeza J.; Ohno K.; Hülsmann S.; Armsen W.; Eulenburg V.; Richter D.W.; Laube B.; Betz H. Deletion of the mouse glycine transporter 2 results in a hyperekplexia phenotype and postnatal lethality. *Neuron*. 40, 797-806 (2003).
22. Donaldson L.F.; Humphrey P.S.; Oldfield S.; Giblett S.; Grubb B.D. Expression and regulation of prostaglandin E receptor subtype mRNAs in rat sensory ganglia and spinal cord in response to peripheral inflammation. *Prostaglandins. Other. Lipid. Mediat.* 63, 109-22 (2001).
23. Mebane H.; Turnbach M.E.; Randich A. Spinal EP receptors mediating prostaglandin E<sub>2</sub>-induced mechanical hyperalgesia, thermal hyperalgesia, and touch-evoked allodynia in rats. *J. Pain*. 4, 392-9 (2003).
24. Breyer R.M.; Bagdasarian C.K.; Myers S.A.; Breyer M.D. Prostanoid receptors: subtypes and signaling. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 41, 661-90 (2001).
25. Narumiya S.; Sugimoto Y.; Ushikubi F. Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol. Rev.* 79, 1193-226 (1999).
26. Singh P.; Hoggatt J.; Hu P.; Speth J.M.; Fukuda S.; Breyer R.M.; Pelus L.M. Blockade of prostaglandin E<sub>2</sub> signaling through EP1 and EP3 receptors attenuates Flt3L-dependent dendritic cell development from hematopoietic progenitor cells. *Blood*. 119, 1671-82 (2012).
27. Iwanaga K.; Okada M.; Murata T.; Hori M.; Ozaki H. Prostaglandin E<sub>2</sub> promotes wound-induced migration of intestinal subepithelial myofibroblasts via EP2, EP3, and EP4 prostanoid receptor activation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 340, 604-11(2012).
28. Furuyashiki T.; Narumiya S. Stress responses: the contribution of prostaglandin E<sub>2</sub> and its receptors. *Nat. Rev. Endocrinol.* 7, 163-75 (2011).
29. Clasadonte J.; Poulain P.; Hanchate N.K.; Corfas G.; Ojeda S.R.; Prevot V. Prostaglandin E<sub>2</sub> release from astrocytes triggers gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuron firing via EP2 receptor activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 108, 16104-9 (2011).
30. Ushikubi F.; Segi E.; Sugimoto Y.; Murata T.; Matsuoka T.; Kobayashi T.; Hizaki H.; Tuboi K.; Katsuyama M.; Ichikawa A.; Tanaka T.; Yoshida N.; Narumiya S. Impaired febrile response in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP3. *Nature*. 395, 281-4 (1998).
31. Matsuoka Y.; Furuyashiki T.; Yamada K.; Nagai T.; Bito H.; Tanaka Y.; Kitaoka S.; Ushikubi F.; Nabeshima T.; Narumiya S. Prostaglandin E receptor EP1 controls impulsive behavior under stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102, 16066-71 (2005).



32. Sorkina T.; Miranda M.; Dionne K.R.; Hoover B.R.; Zahniser N.R.; Sorkin A. RNA interference screen reveals an essential role of Nedd4-2 in dopamine transporter ubiquitination and endocytosis. *J. Neurosci.* 26, 8195-205 (2006).
33. González-González I.M.; García-Tardón N.; Giménez C.; Zafra F. PKC-dependent endocytosis of the GLT1 glutamate transporter depends on ubiquitylation of lysines located in a C-terminal cluster. *Glia.* 56, 963-74 (2008).
34. Fujimuro M.; Yokosawa H. Production of antipolyubiquitin monoclonal antibodies and their use for characterization and isolation of polyubiquitinated proteins. *Methods Enzymol.* 399, 75-86 (2005).
35. Zeilhofer H.U. The glycinergic control of spinal pain processing. *Cell. Mol. Life. Sci.* 62, 2027-35 (2005).
36. Yoshikawa S.; Oguchi T.; Funahashi Y.; de Groat W.C.; Yoshimura N. Glycine Transporter Type 2 (GLYT2) Inhibitor Ameliorates Bladder Overactivity and Nociceptive Behavior in Rats. *Eur. Urol.* (2012) DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eururo.2012.01.044>
37. Haranishi Y.; Hara K.; Terada T.; Nakamura S.; Sata T. The antinociceptive effect of intrathecal administration of glycine transporter-2 inhibitor ALX1393 in a rat acute pain model. *Anesth. Analg.* 110, 615-21 (2010).
38. Chen H.; Polo S.; Di Fiore P.P.; De Camilli P.V. Rapid Ca<sup>2+</sup>-dependent decrease of protein ubiquitination at synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100,14908-13 (2003).
39. Mukhopadhyay D.; Riezman H. Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling. *Science* 315, 201-5 (2007).